It is not just the medium, it is the service.™

低血清 MEM 培养基使用手册

2008

北京清大天一生物技术有限公司

BEIJING TSINGHUA SKYWING BIO TECH Co.,LTD.

目　　录

低血清 MEM 培养基简介 1

低血清 MEM 培养基使用范围 1

低血清 MEM 培养基使用特点 2

低血清 MEM 培养基使用效果 2

低血清 MEM 培养基配制程序 5

低血清 MEM 培养基配制注意事项 5

低血清 MEM 培养基低血清培养 BHK21 细胞程序 6

低血清 MEM 培养基低血清培养 BHK21 细胞注意事项 6

附录 1. 低血清 MEM 培养基使用说明书 8

附录 2. 低血清 MEM 培养基 pH/渗透压对照表 9

附录 3. 参考文献 10

牛血清在细胞培养中的作用及产生的常见问题 10
BHK21 细胞低血清培养基的适应和低血清培养 15
接种密度对 BHK21 细胞在 MEM-SLM 培养液中生长的影响 18
不同血清浓度的低血清培养基培养 BHK21 细胞繁殖口蹄疫病毒的试验研究 22
Vero 细胞、BHK21 细胞的低血清培养和高密度培养研究 25
不同培养基在猪伪狂犬病活疫苗生产中的应用研究 31

低血清 MEM 培养基简介

低血清 MEM 培养基（产品序号：MD611）是北京清大天一生物技术有限公司，为 BHK21 细胞培养设计开发的个性化低血清细胞培养基，可支持BHK21细胞的低血清生长。使用MD611低血清MEM培养基培养BHK21细胞，血清含量可降低到3%～4%，细胞传代分种比例和生长状况良好，可实现低血清培养 BHK21 细胞工业化转瓶生产，是目前国内唯一一种企业大规模使用的产业化的 BHK21 细胞低血清培养基。

MD611 低血清 MEM 培养基是基于传统 MEM 培养基配方的改良培养基，通过调整培养基中主要营养成分的种类、比例、含量，支持 BHK21 细胞低血清培养。MD611 低血清 MEM 培养基配方成分中，不含任何血清替代物、动物来源蛋白、植物蛋白，具有良好的使用安全性。

使用 MD611 低血清 MEM 培养基低血清培养 BHK21 细胞，降低培养细胞的血清使用量，有益于减少血清成分以及血清中潜在外源病毒对产品质量的危害，可提高产品质量。使用 MD611 低血清 MEM 培养基低血清培养 BHK21 细胞，在降低血清的情况下，能提高细胞传代分种比例，并提高病毒产率，可降低产品生产成本。

MD611 低血清 MEM 培养基为粉末培养基，包装规格为 50L/包。与传统的 MEM 培养基比较，配制使用方法基本相同，使用方法简单方便。

MD611 低血清 MEM 培养基的生产、检验严格执行 GMP 和 ISO9001 管理体系，产品质量符合国家化工行业标准《哺乳类动物细胞培养基》要求，产品质量稳定可靠。

低血清 MEM 培养基使用范围

MD611 低血清 MEM 培养基为 BHK21 细胞低血清培养的专用个性化培养基。

MD611 低血清 MEM 培养基可用于口蹄疫疫苗、兽用狂犬病疫苗等疫苗生产中 BHK21 细胞制备，BHK21 细胞可使用方瓶、3L 转瓶、以及 15L 转瓶培养。与传统 MEM 培养基比较，使用 MD611 低血清 MEM 培养基培养 BHK21 细胞，培养血清含量可降低为 3%～4%，可提高细胞传代分种比例、减少细胞培养时间、提高 BHK21 细胞活力，适用于 BHK21 细胞建库、种细胞复苏传代、以及细胞生产制备。

MD611 低血清 MEM 培养基可用于口蹄疫疫苗生产中口蹄疫病毒制备，用 MD611 低血清 MEM 培养基替代传统的口蹄疫病毒培养维持液（乳欧液），可提高口蹄疫病毒滴度，适用于口蹄疫病毒种毒制备，以及病毒培养液的生产。

MD611 低血清 MEM 培养基可用于兽用狂犬病疫苗生产中狂犬病毒制备，适用于狂犬病毒毒种制备，以及病毒培养液的生产。

MD611 低血清 MEM 培养基支持高密度 BHK21 细胞悬浮培养，可使用摇瓶或生物反应器悬浮培养 BHK21 悬浮适应细胞株，细胞生长良好。

MD611 低血清 MEM 培养基支持生物反应器微载体贴壁培养 BHK21 细胞，细胞能良好生长。

MD611 低血清 MEM 培养基可用于各种基于 BHK21 细胞的科研和检验，用 MD611 低血清 MEM 培养基培养制备 BHK21 细胞，细胞具有生长旺盛、活力强等优点，有利于提高科研和检验工作的方便性和可靠性。

MD611 低血清 MEM 培养基还适用于其他用 MEM 培养基培养的细胞，如鸡胚成纤维细胞的低血清培养，用于猪伪狂犬病活疫苗生产。

低血清 MEM 培养基使用特点

MD611 低血清 MEM 培养基为 BHK21 细胞低血清培养的专用个性化培养基，其培养 BHK21 细胞具有以下特点：

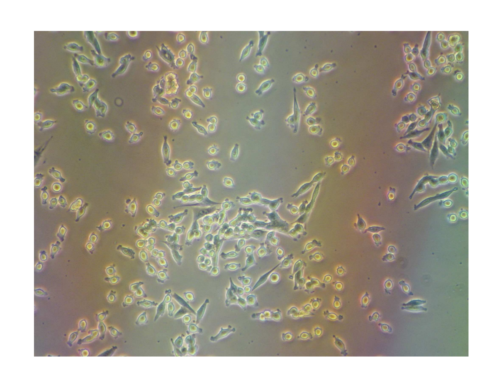
- 支持低血清培养，血清含量可降低到 3%～4%，降低了培养液成本。
- 减少血清使用量，降低接种副反应，提高产品质量。
- 不含血清替代物、动物来源蛋白、以及植物蛋白、酵母水解物，具有使用安全性。
- 细胞生长旺盛，生长速度快。
- 细胞培养形态健壮、稳定，细胞活力强。
- 具有较高分种比率，方瓶静止培养分种比例可达 1:10～1:12，转瓶培养分种比例可达 1:8～1:9，甚至更高，提高细胞产量 50%。
- 减少 BHK21 细胞培养时间，细胞培养 48 小时即可传代。设备利用率得到提高，增加了生产能力。
- 细胞易培养，可提高细胞培养的稳定性。
- 提高病毒产率和产量。
- 细胞培养阶段不需要使用水解乳蛋白。

低血清 MEM 培养基使用效果

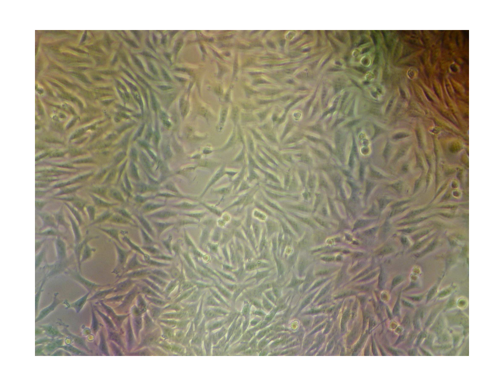
采用分阶段驯化法驯化 BHK21 细胞适应 MD611 低血清 MEM 培养基，经 5～6 代后细胞逐渐适应，可建立生产用细胞种子库。已适应 MD611 的 BHK21 细胞在血清含量大于 2%的情况下均能稳定传代，连续传代均在 30 代以上，能够满足生产需要。

MD611 低血清 MEM 培养基低血清方瓶培养 BHK21 细胞

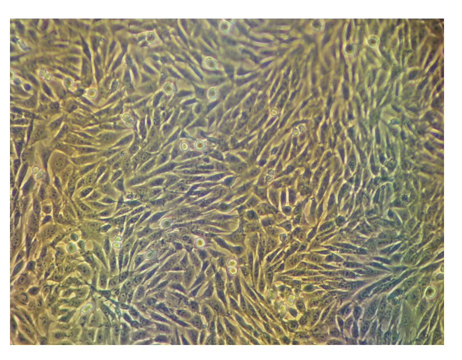
使用 MD611 低血清 MEM 培养基，在 T75 细胞培养瓶中，低血清（3%血清含量）培养 BHK21 细胞，细胞轮廓清晰并具有较强立体感，形态良好，细胞生长旺盛，可以大分种比例进行细胞传代培养。以 1:10 分种比例进行细胞传代培养，接种培养 4 小时，细胞开始贴壁伸展；培养 18 小时，细胞进入快速生长期；培养 24 小时，生长为单层细胞；培养 48 小时，细胞生长为致密单层。



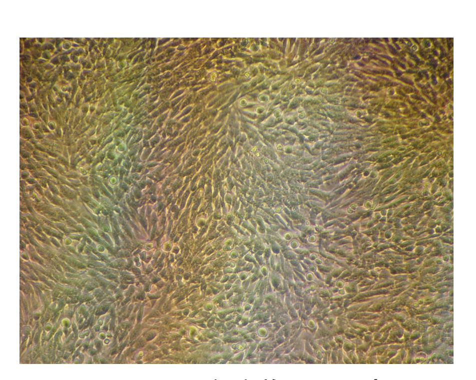
BHK21 细胞培养 4 小时



BHK21 细胞培养 18 小时



BHK21 细胞培养 24 小时



BHK21 细胞培养 48 小时

MD611 低血清 MEM 培养基低血清培养 BHK21 细胞生产口蹄疫疫苗

以 MD611 低血清 MEM 培养基低血清培养 BHK21 细胞生产口蹄疫疫苗，BHK21 细胞可连续传代 30 代以上，培养细胞生长数量与传统 MEM（10%血清含量）培养基培养效果相当。（见表 1）接种口蹄疫病毒后，MD611 低血清 MEM 培养基低血清培养 BHK21 组病毒效价不低于传统 MEM（10%血清含量）培养基细胞组，符合疫苗规程，BHK21 细胞在适应 MD611 低血清 MEM 培养基后，对口蹄疫病毒仍然敏感。（见表 2）

表 1 MD611 低血清 MEM 培养基培养 BHK21 细胞的生长情况（$\times 10^7$）

组别	细胞接种量（0h）	细胞数量(24h)	细胞数量（48h）	细胞数量(72h)	连续传代次数
MEM 培养基 +10%血清（对照组）	0.462	0.83	1.86	2.51	30 代
MD 611 +2%血清	0.387	0.68	1.84	2.20	30 代
MD 611 +3%血清	0.403	0.752	2.28	2.04	30 代

表 2　MD611 低血清 MEM 培养基培养 BHK21 细胞繁殖口蹄疫病毒的效价

组别	第一次试验		第二次试验		第三次试验		平均值	
	$TCID_{50}$	LD_{50}	$TCID_{50}$	LD_{50}	$TCID_{50}$	LD_{50}	$TCID_{50}$	LD_{50}
MEM 培养基 +10%血清（对照组）	7.5	8.0	7.61	7.67	7.5	7.5	7.54	7.72
MEM SLM+2%血清	7.61	8.5	8.17	8.0	7.83	7.67	7.87	8.0
MEM SLM+3%血清	8.0	8.33	7.83	8.0	7.61	7.67	7.83	8.0

MD611 低血清 MEM 培养基低血清培养鸡胚成纤维细胞生产猪伪狂犬病活疫苗

利用猪伪狂犬病毒弱毒株（Bartha-K61）进行细胞培养，观察不同细胞培养基维持鸡胚成纤维细胞单层（CEF）生长情况，并测定病毒产量（$TCID_{50}$/ml）。结果在生产条件下，应用低血清培养基（MEM SLM）添加 0.5～2%新生犊牛血清，制备的维持液培养细胞单层生长良好，细胞间隙不明显，细胞形态正常。细胞单层接种病毒培养 18～24 小时左右，有少量细胞形成 CPE，继续培养至 48 小时左右，70%以上细胞产生 CPE，此时病毒增殖达到高峰，测定病毒产量达到 $2\times10^{-6.75}$～$2\times10^{-7.5}$$TCID_{50}$/ ml，符合猪伪狂犬病活疫苗制苗要求，实际应用低血清培养基制备的活疫苗可有效防制疫苗注射引起的过敏反应。（见表 3 和表 4）

表 3　MD611 养基培养 CEF 细胞生长情况和病毒特异性 CPE 形成情况比较

组别		维持液种类	血清含量(%)	细胞单层生长状态	病毒特异性 CPE 形成（18 小时）
试验组	I	MD611	2%	细胞单层生长状态优良，无可见细胞间隙，细胞形态良好	少量细胞形成 CPE
	II	MD611	0.5%	细胞单层生长良好，细胞间隙不明显，细胞形态正常	少量细胞形成 CPE
对照组	I	BD-199	2%	细胞单层生长良好，细胞之间间隙很少，形态正常	少量细胞形成 CPE
	II	BD-199	1%	细胞单层生长状态变差，形态瘦长，细胞间隙增大	少量细胞形成 CPE

表 4　MD611 低血清 MEM 培养基在猪伪狂犬病活疫苗生产中不同批次细胞毒液的 $TCID_{50}$/ ml 比较

批次	维持液种类	维持液血清含量	$TCID_{50}$/ ml
060713	BD-199	2%	$2\times10^{-7.0}$
	MD611	2%	$2\times10^{-7.25}$
060728	BD-199	2%	$2\times10^{-7.25}$
	MD611	2%	$2\times10^{-7.5}$
060811	BD-199	2%	$2\times10^{-7.25}$
	MD611	2%	$2\times10^{-7.25}$
060818	BD-199	2%	$2\times10^{-7.0}$
	MD611	2%	$2\times10^{-7.25}$
070503	BD-199	1%	$2\times10^{-6.5}$
	MD611	0.5%	$2\times10^{-7.0}$
070510	BD-199	1%	$2\times10^{-6.75}$
	MD611	0.5%	$2\times10^{-7.25}$
070523	BD-199	1%	$2\times10^{-6.25}$
	MD611	0.5%	$2\times10^{-6.75}$
070530	BD-199	1%	$2\times10^{-6.5}$
	MD611	0.5%	$2\times10^{-7.0}$

低血清 MEM 培养基配制程序

以 50L/包规格 MD611 低血清 MEM 培养基为例，应按以下程序配制培养基:

1. 打开培养基包装，将培养基全部倒入一容器中。
2. 用少量冷却注射用水（20℃～30℃）涮洗袋内残留培养基，倒入容器内。
3. 向容器中加入约 40L 冷却注射用水（20℃～30℃），搅拌至培养基完全溶解。
4. 按使用说明书标示量加入 114.5 克碳酸氢钠，搅拌至完全溶解，补加冷却注射用水（20℃～30℃）至 50L，充分混合，用 pH 计检测，溶液 pH 应为 7.2～7.4。
5. 按使用量加入血清和抗生素，混合均匀，用 0.22μm 滤膜正压过滤除菌。
6. 除菌后培养基，置 2℃～8℃避光保存，应在一周内使用。

低血清 MEM 培养基配制注意事项

- 不可配制成浓缩液储存使用。
- 不可用高压湿热法进行灭菌。
- 不可冷冻储存，溶解使用。
- 不可常温储存，2～8℃储存应不超过 1 周时间。
- 该培养基中已含谷氨酰胺，由于谷氨酰胺不稳定，易分解，产生 BHK21 细胞敏感的毒性物质，故加入血清的完全培养液应尽快使用完毕。
- 按标示量加入碳酸氢钠 pH 应为 7.2～7.4，过滤后 pH 可升高 0.1～0.2；如用开放式大罐长时间搅拌配液，可导致 pH 升高；如使用容器长时间储存，也可能导致 pH 升高。应注意不同配液方式对培养液 pH 的影响。
- 该培养基中所含指示剂酚红的量是常规量的一半，故从外观上看所配溶液颜色较浅，精确判定 pH 时，建议用 pH 计测定 pH。
- 按标示量加入碳酸氢钠，如达不到所需 pH 要求，应用 1N 氢氧化钠调节到所要求 pH 范围。如用碳酸氢钠调 pH 至 7.6 以上，应注意培养液渗透压的增加，可能影响细胞正常培养。

低血清 MEM 培养基低血清培养 BHK-21 细胞程序

传代种细胞选择标准

应选择形态良好、正常健康、分布均匀的细胞瓶细胞。
应选择形成单层或致密单层的处于对数生长期的细胞瓶细胞。
应选择培养液 pH 大于 6.8～7.0 的细胞瓶细胞。

细胞消化

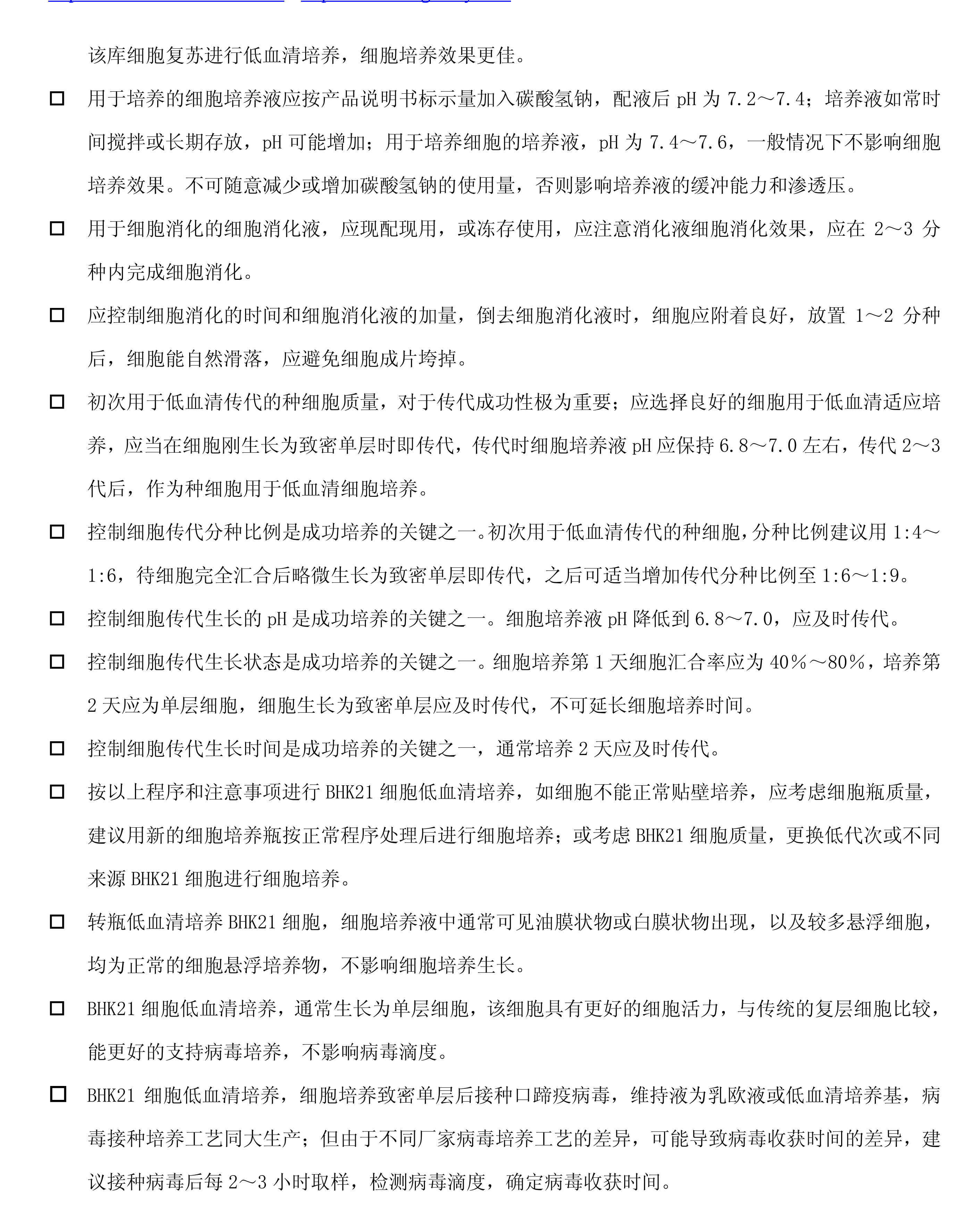
细胞消化液为含 0.25％胰蛋白酶和 0.025％EDTA 消化液，建议使用 Hanks’液或 PBS 溶液配制，pH 为 7.6～7.8。细胞消化配制后应及时使用。
将细胞生长良好的培养瓶，轻微摇瓶后倒去细胞培养液，加入适量细胞消化液，转动细胞瓶使细胞消化液浸润细胞 1～3 分种，倒去细胞消化液，静止细胞瓶待细胞滑落，加入细胞培养液，摇瓶分散细胞。

细胞分种、细胞培养

按 1:6～1:9 分种比例分种细胞。选择合适的分种比例，应控制分种后培养 1 天时细胞汇合率为 40％～80％为宜。
细胞培养液使用血清含量为 4～5％。
15L 转瓶细胞培养液加量为 2～2.5L。
15L 转瓶细胞培养温度为 37±0.5℃，转数 10～12rpm。
细胞培养时间为 2 天，细胞应生长为致密单层，pH 应大于 6.8～7.0。
当细胞生长为致密单层后应及时传代。

低血清 MEM 培养基低血清培养 BHK-21 细胞注意事项

- 细胞培养使用血清浓度为 2％～5％，由于国内血清质量差异，建议使用前进行细胞培养筛选，并建议实际使用血清浓度不低于 3% 。
- BHK21 细胞可直接用 4～5％血清浓度培养基进行转瓶细胞培养，培养初期可能细胞培养状态略差，适应几代后能良好生长。
- 如用方瓶进行 4～5％血清浓度培养基进行几代适应培养后再进行转瓶培养，细胞培养效果更好。
- 如依次用 10%血清浓度、8%血清浓度、5%血清浓度、3%血清浓度传代适应细胞，细胞培养效果更好。
- 如用 4～5％血清浓度培养基进行 BHK21 细胞适应培养后，冻存适应的细胞建立低血清细胞种子库，用



该库细胞复苏进行低血清培养，细胞培养效果更佳。

- 用于培养的细胞培养液应按产品说明书标示量加入碳酸氢钠，配液后 pH 为 7.2～7.4；培养液如常时间搅拌或长期存放，pH 可能增加；用于培养细胞的培养液，pH 为 7.4～7.6，一般情况下不影响细胞培养效果。不可随意减少或增加碳酸氢钠的使用量，否则影响培养液的缓冲能力和渗透压。
- 用于细胞消化的细胞消化液，应现配现用，或冻存使用，应注意消化液细胞消化效果，应在 2～3 分种内完成细胞消化。
- 应控制细胞消化的时间和细胞消化液的加量，倒去细胞消化液时，细胞应附着良好，放置 1～2 分种后，细胞能自然滑落，应避免细胞成片垮掉。
- 初次用于低血清传代的种细胞质量，对于传代成功性极为重要；应选择良好的细胞用于低血清适应培养，应当在细胞刚生长为致密单层时即传代，传代时细胞培养液 pH 应保持 6.8～7.0 左右，传代 2～3 代后，作为种细胞用于低血清细胞培养。
- 控制细胞传代分种比例是成功培养的关键之一。初次用于低血清传代的种细胞，分种比例建议用 1:4～1:6，待细胞完全汇合后略微生长为致密单层即传代，之后可适当增加传代分种比例至 1:6～1:9。
- 控制细胞传代生长的 pH 是成功培养的关键之一。细胞培养液 pH 降低到 6.8～7.0，应及时传代。
- 控制细胞传代生长状态是成功培养的关键之一。细胞培养第 1 天细胞汇合率应为 40%～80%，培养第 2 天应为单层细胞，细胞生长为致密单层应及时传代，不可延长细胞培养时间。
- 控制细胞传代生长时间是成功培养的关键之一，通常培养 2 天应及时传代。
- 按以上程序和注意事项进行 BHK21 细胞低血清培养，如细胞不能正常贴壁培养，应考虑细胞瓶质量，建议用新的细胞培养瓶按正常程序处理后进行细胞培养；或考虑 BHK21 细胞质量，更换低代次或不同来源 BHK21 细胞进行细胞培养。
- 转瓶低血清培养 BHK21 细胞，细胞培养液中通常可见油膜状物或白膜状物出现，以及较多悬浮细胞，均为正常的细胞悬浮培养物，不影响细胞培养生长。
- BHK21 细胞低血清培养，通常生长为单层细胞，该细胞具有更好的细胞活力，与传统的复层细胞比较，能更好的支持病毒培养，不影响病毒滴度。
- BHK21 细胞低血清培养，细胞培养致密单层后接种口蹄疫病毒，维持液为乳欧液或低血清培养基，病毒接种培养工艺同大生产；但由于不同厂家病毒培养工艺的差异，可能导致病毒收获时间的差异，建议接种病毒后每 2～3 小时取样，检测病毒滴度，确定病毒收获时间。

附录 1. 低血清 MEM 培养基使用说明书

产品代号： MD611-050 每升标示量：12.48g 标准编号：HG/T 3935-2007

一.【主要成分】

无机盐：氯化钠、氯化钙、氯化钾、无水磷酸二氢钠、无水磷酸氢二钠、六水合氯化镁等。

氨基酸：L-盐酸精氨酸、L-盐酸赖氨酸、L-谷氨酰胺、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸等。

维生素：维生素 B1、维生素 B2、维生素 B12、维生素 C、D-生物素、泛酸钙等。

其 它：无水葡萄糖、丙酮酸钠、次黄嘌呤、亚油酸、硫辛酸、苯酚红等。

二.【产品指标】

性状		粉红色固体粉末
澄清度		澄清
pH 值	①加 $NaHCO_3$	7.00～7.60
	②不加 $NaHCO_3$	5.20～5.80
干燥减量的质量分数（%）		≤5.0
渗透压（mOsm/kgH_2O）	①加 $NaHCO_3$	295～326
	②不加 $NaHCO_3$	247～273
细菌内毒素（EU/ml）		＜10
微生物限度检查（CFU/g）	细菌数	≤200
	霉菌数	≤50
细胞生长试验	细胞形态	成纤维贴壁生长，形态正常无变异
	细胞数量	72h 细胞数量＞$1×10^5$ 个/ml。继续维持 48h,细胞数量≥$1×10^5$ 个/ml。
注：详细产品技术指标见质量标准		

三.【使用方法】

将一袋培养基全部倒入一容器中，用少量注射用水将袋内残留培养基洗下，并入容器。加注射用水（水温 25℃～30℃）到 47.5 升，轻微搅拌溶解。

加入 114.5 克碳酸氢钠。

轻微搅拌溶解，加注射用水至 50 升。

用 1mol / L 氢氧化钠溶液或 1mol / L 盐酸溶液调 pH 至所需值。

用 0.2μm 滤膜正压过滤除菌。

溶液应在 2℃～8℃下避光保存。

四.【贮藏】 2℃～8℃冷藏，干燥、密封、避光贮藏。

五.【规格】 50L/包

六.【有效期】 二年

备注：

1. 本产品成分为化学结构明确的物质，无动物来源物质。
2. 建议使用本品小牛血清添加量不低于 3%培养 BHK21 细胞。

注意事项：

低血清培养基营养成分优于基础培养基，易使细胞增殖迅速，代谢旺盛，代谢产物对细胞有不良影响，易产生细胞老化脱落现象。建议密切关注 pH 的变化，在适当的时候增加换液频率或传代频率。

由于本品苯酚红含量较少，不要用肉眼观察颜色来判断 pH 值，建议使用 pH 计检测 pH 值。

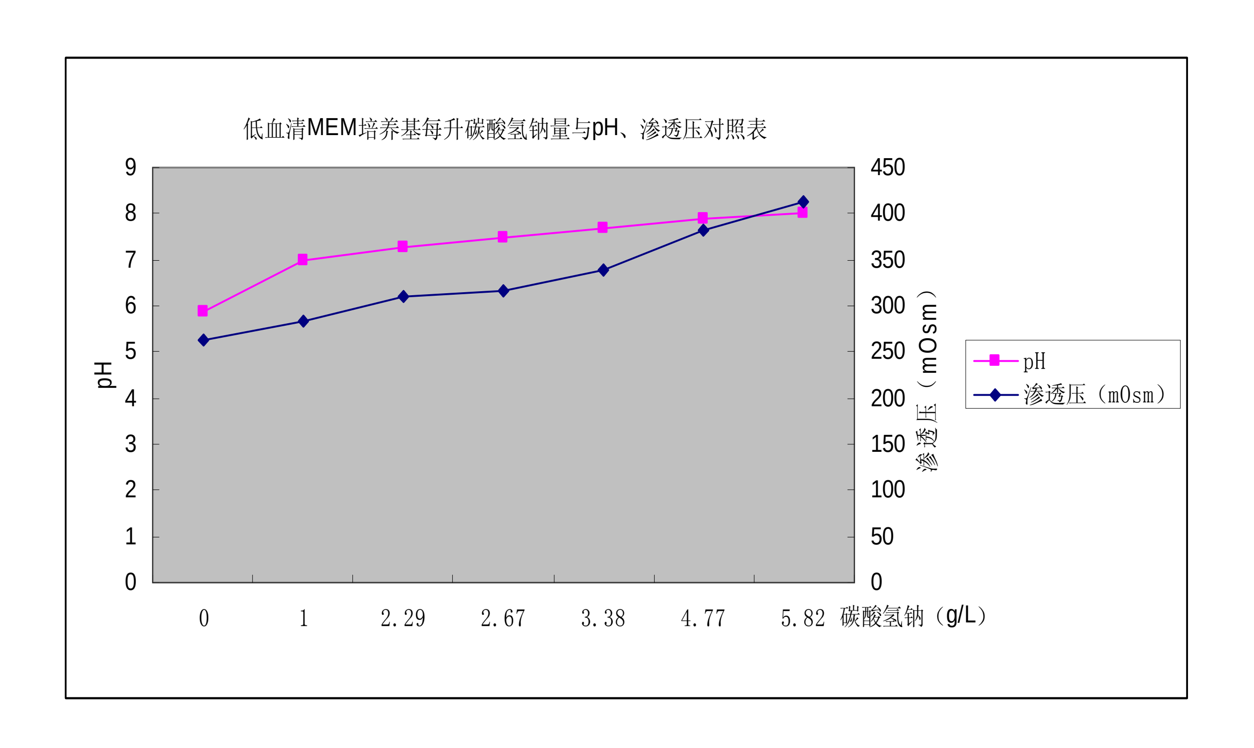
生产企业: 北京清大天一生物技术有限公司

地 址: 北京昌平科技园区白浮泉路 11 号

电 话: 010-80110922 80110683

附录 2. 低血清 MEM 培养基 pH/渗透压对照表

$NaHCO_3$ 量（g/L）	pH	渗透压（mOsm）
0	5.88	264
1	7.00	283
2.29	7.29	310
2.67	7.5	317
3.38	7.7	340
4.77	7.9	382
5.82	8.0	412



附录 3. 参考文献

牛血清在细胞培养中的作用及产生的常见问题

杨先庭
（北京清大天一生物技术有限公司）

现代生物技术包括基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程，这些技术的发展几乎都与细胞培养有密切的关系，特别是在生物医药领域，细胞培养更具有特殊的作用。比如基因工程药物或疫苗在研究生产过程中很多都是通过细胞培养来实现的，基因工程乙肝疫苗大多是以 CHO 细胞作为载体；基因工程抗体药物的制备也离不开细胞培养。细胞工程领域更离不开细胞培养技术，杂交瘤单克隆抗体的研究制备完全是通过细胞培养来实现的，发酵工程和酶工程有的也与细胞培养密切相关。总之，细胞培养在整个生物技术产业的发展中起到了很关键的核心作用。细胞培养的发展，培养基的质量是关键，而培养基的构成中动物血清对细胞的生长繁殖起着重要作用。在动物血清中牛血清的应用又是最广泛的，所以牛血清的质量好坏直接影响生物制品的质量和安全性。

一、牛血清的主要成分

牛血清是一种成分复杂的混合物，其大部分成分已为人所知，但还有一部分仍不清楚，而且血清的组成及含量通常随供血动物的性别、年龄、生理条件和营养条件不同而存在差异。牛血清主要成分有以下几类：

1、蛋白质类 包括白蛋白、球蛋白、α-巨球蛋白（抑制胰蛋白酶的作用）、胎球蛋白（促进细胞附着）、转铁蛋白（能结合铁离子，减少其毒性和被细胞利用）、纤维粘连素（促进细胞附着生长）等；

2、多肽类 主要是一些促进细胞生长和分裂的生长因子，最主要的生长因子是血小板生长因子，还有成纤维细胞生长因子、表皮细胞生长因子、神经细胞生长因子等，虽然在血清中含量很少，但对细胞的生长和分裂也起着重要作用；

3、激素类 激素对细胞的作用是多方面的。包括：

胰岛素：促进细胞摄取葡萄糖和氨基酸，与促细胞分裂有关；

类胰岛素生长因子：能与细胞表达的胰岛素受体结合，从而有胰岛素同样的作用：

促生长激素：促进细胞增殖的效应；

氢化可的松：血清中含有微量该成分，它可能具有促细胞贴附和增殖作用。但有人证明，血清中 的氢化可的松，在细胞密度较高时可能有抑制细胞生长和诱导细胞发生分化的作用。

4、其他成分 如氨基酸、葡萄糖、微量元素等。在合成培养基中这些成分的作用并不明显，与蛋白相结合的微量元素对细胞生长起促进作用。

二、牛血清在细胞培养基中的主要功能

牛血清是细胞培养中用量最大的天然培养基，含有丰富的细胞生长必须的营养成份，具有极为重要的功能。

1、提供能促使细胞指数生长的激素、基础培养基中没有或含量微小的营养物，以及某些低分子营养物质；

2、提供结合蛋白，识别维生素、脂类、金属离子，并与有毒金属和热源物质结合，起解毒作用；

3、是细胞贴壁、铺展生长所需因子的来源；

4、起酸碱度缓冲液作用；

5、提供蛋白酶抑制剂，细胞传代时使剩余胰蛋白酶失活，保护细胞不受损伤。

三、牛血清的分类

根据牛出生时间和血清采制分离方法分为：

1、胎牛血清：八月龄胎牛心脏穿刺取血；

2、新生牛血清：出生 12～24 小时新生牛静脉采血；

高级新生牛血清：采血后静置自然析出的血清；

标准新生牛血清：经离心分离的血清；

普通新生牛血清：融血或微融血的血清；

3、小牛血清：出生三月龄小牛动脉采血分离血清；

四、牛血清的质量要求

（一）WHO 公布的《用动物细胞体外培养生产生物制品规程》中的要求

1. 牛血清必须来自有文件证明无牛海绵状脑病的牛群或国家，并应具备适当的监测系统。

2.有些国家还要求牛血清来自没有用过反刍动物蛋白饲料喂养的牛群。

3.要能证明所用牛血清中不含对所生产疫苗病毒的抑制物。

4.血清要通过滤膜过滤除菌，保证无菌。

5.无细菌、霉菌、支原体和病毒的污染，有些国家要求无大肠杆菌噬菌体污染。

6.要求血清对细胞有良好的支持繁殖作用。

（二）我国在对牛血清的质量标准最早在 2000 年版《中国生物制品主要原辅材料质控标准》中提出。包括物理性状、总蛋白，血红蛋白、细菌、真菌、支原体、牛病毒、大肠杆菌噬菌体、细菌内毒素，支持细胞增殖检查。2005 版药典颁布之后，小牛血清质量标准被纳入《中国药典》2005 年版 第三部 生物制品分册。

（三）美国对牛血清的质量要求：

Gibco 和 Hyclone 等美国主要血清供应商的牛血清都已进入到我国市场，他们对血清质量标准有严格要求，从血清来源到产品质量都有明确规定。

1、血清来源 ：可从世界各地收集胎牛血清，但必须符合其质量标准和美国农业部进口要求。

2、血清的收集：必须符合工业生产的标准，低温采集，一次分离，分离后立即混合冻存。

3、血清的制备：超低 IgG 胎牛血清、透析血清、γ-射线辐照；

4、除菌过滤：0.22μm 和 0.1μm 滤膜过滤；

5、成品分装：根据需要分装成不同规格。

五、牛血清质量检定指标

1、化学检定：包括渗透压（240～340）、pH（7.0～8.0）、总蛋白含量（3.5～5.0％）、血红蛋白 （≤0.02％）

2、 微生物检查：细菌和真菌——直接培养法、噬菌体——噬斑法和增殖法 支原体——培养法和 DNA 染色法 、牛病毒——细胞培养法。要求均为阴性

3、内毒素检测——凝胶法和动态浊度法 要求内毒素含量≤10EU/ml

4、促细胞生长测定（SP2/0-Ag14 标准规定）

1）最大增殖浓度≥1.0×10^{6} 个/ml、倍增时间≤20 小时

克隆率＝（阳性孔平均数/培养孔总数）×100％

2）贴壁效率（ VERO 细胞、二倍体细胞等）

10％血清——50 或 100 个细胞/孔

贴壁效率（％）＝（每孔克隆平均数/每孔存活的培养细胞平均数）×100

相对贴壁效率＝被测血清贴壁效率/参考血清贴壁效

以上项目检定结果应符合 2005 版《中国药典》第三部的相关规定。血清厂家应在此基础上结合疫苗病毒生产工艺建立企业内控检定项目并建立相应的检定方法，保证疫苗病毒生产的稳定性，提高疫苗制品的质量。

六、牛血清的使用所产生的常见问题

（一）由于血清营养丰富，贮存条件特殊，因此在贮存和使用过程中容易产生以下问题：

1、改变培养液的 pH 值

牛血清的 pH 理论值为 7.0～8.0，培养基在加入规定量的碳酸氢钠后（即达到细胞生长所需要的渗透压），再加入 10％的牛血清，一般会使培养液的 pH 值发生改变。因此在使用过程中应注意 pH 的变化，如有必要可用 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 调 pH 到所需值。

2、由于血清的营养成分丰富，非常适合细菌、真菌和支原体等生长。国产血清大部分采用手工分装，因此容易把微生物带入而使得血清被污染。使用前如果没有及时发现，将会把污染物带入正在培养的细胞中，而使得细胞不能正常生长。

3、血清在贮存解冻过程中会产生沉淀，这是由于血清中含有大量脂蛋白、纤维蛋白及多肽类物质，在-15℃冷冻保存解冻后就会自然形成沉淀，随着保存时间的延长，沉淀量会增加。因此在融化血清时一般应先在 4℃放置使之解冻，然后放在室温使血清完全融化，以避免沉淀的增加。添加血清时应避免把沉淀加入

培养液，否则由于沉淀的存在会使得所培养的细胞产生大量黑点，或者细胞表面将会覆盖一层油状物质，影响细胞的正常生长。为减少血清的损失，可以把有沉淀的血清收集起来进行离心处理，将上清液加入培养液使用（一般不建议采用过滤的方法除去沉淀，因为沉淀会堵塞滤膜而无法过滤）。

（二）大规模细胞培养中牛血清对细胞及病毒滴度的影响

血清是一种成分复杂的混合物，不同批次血清对细胞生长的促进作用不同。大规模细胞培养中由血清引起的细胞生长状态不佳及病毒滴度的影响表现在以下几个方面：

1、细胞生长速度缓慢，长满单层时间长；从同一细胞瓶中分出两瓶细胞，用同一种培养液，分别加入 10％的对照血清和待检血清，在相同条件下培养 72 小时，会出现对照血清长满单层，而待检血清大约只有 60～70％，这种血清就不适合用来大规模培养细胞。

2、细胞传代后形态不正常，细胞状态发生变化 ；由于血清的质量问题，使原本状态正常的细胞经传代后形态会变差；比如：细胞瓶里会出现一些蠕动的小黑点（并非污染），或者细胞表面形成一层油状覆盖物；细胞的轮廓变得模糊，细胞之间的间隙被血清中的蛋白颗粒填充，从而影响细胞向四周扩展生长。

3、细胞传几代后就出现脱壁现象，不能连续传代 ；质量较差的血清缺乏某种细胞的贴壁因子，会使细胞在传代过程中逐渐丧失贴壁的能力。细胞会从正常的贴壁状态，边缘开始萎缩，上翘。观察到的现象就是细胞表面不光滑，晃动细胞瓶会看到细胞表面有絮状物随培养液波动。随着传代次数增加，细胞萎缩的情况越来越严重，直到最终完全脱壁而死亡。

4、细胞长的很好，致密的单层，状态也很正常，但是接毒后细胞基本不发生病变，做滴度检测几乎测不出抗原滴度。这种情况也许是因为血清中含有与接种的病毒有同源的特异性抗体。比如血清中经常会存在乙脑抗体，牛腹泻病毒抗体等，如果存在这些抗体，就会把接进去的病毒给中和掉。如果抗体滴度很高，病毒会被抗体完全中和，就没有病毒颗粒在细胞中增殖，所以会检测不到病毒滴度。这种情况给疫苗企业造成的损失是相当大的，不产毒等于前面所做的那么多工作全部白费，浪费人力、物力，尤其是时间上的浪费，从培养细胞开始到接病毒，到收液至少需要一两个月，一旦出现不产毒的情况，那么这一两月时间就白白浪费掉了，这也是牛血清给疫苗企业造成的风险之一。

5、细胞生长的状态一般，产毒少，毒价低。这种情况比较常见，细胞是病毒的载体，由于血清质量不好，导致细胞生长状态不好，病毒就无法进行正常的复制。并非所有病毒都不能复制，所以就造成疫苗的效价不够，可能造成不合格产品。

（三）牛血清给生物制品带来的问题

对于使用传统培养基培养的大多数细胞来说，添加牛血清是必不可少的。但是牛血清的使用也给细胞培养和生物制品的生产带来很多问题，并成为生物制品生产水平达到最优化和实现经济性目标的一大障碍。

1、批间差异　血清是一种成分复杂而且不确定的混合物，不同来源的血清成分存在很大的差异，因此支持细胞生长的效果也有较大差别。而每批血清的批量是有限的，所以换血清批号时要预先做大量的筛选实验，以确定对细胞生长影响最小的血清。不但增加工作量,而且如果因为一时筛选不出合适的血清还会导致生产停滞。

2、动物来源成分　因为来源于动物,所以有可能携带传染源,包括病毒和有毒物质,任何一种传染源都有可能

对正在生长的细胞系或者制品带来风险；不同来源的血清存在某些特异性病毒抗体（比如：乙脑抗体、牛腹泻性病毒抗体等），直接影响接毒后病毒的复制，可能导致不产毒或毒价偏低，从而给疫苗生产造成巨大损失。

3、提高生产成本 目前市场销售的血清平均价格约 0.25 元/ml，按 10%添加量计算，1L 培养液中血清所占的成本是 25 元，培养基及其他添加物的成本约为 6 元，每升培养液的成本中血清约占 80%，由此可见血清在疫苗生产中占据了大量的生产成本。

4、行业竞争导致质量难以提高 由于国内牛血清生产厂家增多，而用户的数量有限。为了获得客户资源，很多血清厂家都在进行低价销售，行业内形成一种恶性的价格竞争。低价格带来的结果就是低质量的血清。目前很多血清厂家都处于维持生存的状态，因此难以投入大量资金和人力来提高血清的质量。

5、血清蛋白引起的疫苗纯化问题

由于血清含有大量的不同分子量的未知蛋白和多肽类物质，势必会增加提取,分离,纯化的步骤,增加了下游纯化处理的难度,因此在疫苗纯化阶段给纯化工作带来很大的困难；疫苗产品中牛血清白蛋白残留量要求不高于 50ng/剂，为达到纯化的目的，纯化工艺不得不添加新的仪器设备；在除去牛血清白蛋白残留的同时，也会损失大量的有效目的产物，从而降低了疫苗的产率；牛血清中的某些蛋白与目的产物的分子量接近，在纯化过程中不能完全被去除，由于血清残留而导致的生物制品不合格,或者因为杂蛋白含量大造成严重不良反应的情况时有出现.因此也会严重影响疫苗产品的质量。

6、相关法规对牛血清使用的规定

为了使与传染源相关的风险降到最低，国际上存在多个国家之间限制进出口生物材料的国际法规；美国、欧盟和日本等发达国家和地区计划在 2010 年全面停止血清在生物制药中的应用；FDA 目前已不受理利用血清进行细胞培养的新药申报；FDA 与美国农业部已经严密控制胎牛血清在细胞培养中的使用，疯牛病和口蹄疫的流行导致对牛血清控制使用更加严密；2003 年 4 月，Vera Baumans 和 Jan van der Valk 组织召开题为"改进体外培养技术方法，替换胎牛血清"的会议，讨论 FBS 的使用问题，在全球范围内号召减少 FBS 的使用；因此，预计政府部门对胎牛血清加工或使用的限制将会更加严厉。

药品管理法对生物制品的质量提出严格要求，尤其是我国加入 WTO 之后，在制品的质量上要求更严格。产品的市场竞争应主要靠质量竞争，所以对制品的主要原材料的质量要求也会越来越严格。牛血清作为生物制品生产所需的一种原材料，其质量的好坏直接关系到制品的质量和安全性，由牛血清给生物制品带来的问题也日益凸现。细胞大规模培养及减少动物来源成分在生物制品中的使用已成为今后生物制药发展的趋势，为提高制品的质量和安全性，生物制品生产过程应尽量降低血清的使用量或寻找替代血清及动物组分的原材料。

BHK21 细胞低血清培养基的适应和低血清培养

刘学荣，董文教，宋玉霞，牟会琴，王晶，王国燕，董金杰，陈苗苗，牟克斌，黄银君

（中农威特生物技术股份有限公司，甘肃兰州 730046）

摘要：本研究选用商业化的低血清培养基 MEM SLM ，以 D201 培养基＋10%血清培养的细胞为对照组，采用分阶段驯化法驯化 BHK21 细胞适应 MEM SLM ，当细胞的比生长率、细胞数量等参数与对照组相近时，则认为细胞驯化成功，在此基础驯化细胞适应低血清培养环境。结果显示细胞在驯化初期细胞很难适应 MEM SLM，在 5～6 代后细胞逐渐适应 MEM SLM，细胞比生长率和细胞活性与对照组相近；在低血清培养驯化过程中发现，用 MEM SLM 培养 BHK21 细胞时仍需添加一定量的血清。并筛选出能稳定传代、繁殖较快、能适应大规模生产需要的细胞，建立生产用细胞种子库。

关键词： BHK21 细胞；低血清培养基；低血清培养

动物细胞大规模培养广泛应用于抗体药物、基因治疗药物、疫苗以及基因工程药品等生物制品的生产，目前主要采用最基础的合成细胞培养基，甚至天然培养基（如水解乳蛋白）加入 10％左右新生牛血清，在转瓶中培养细胞。但是这些动物来源成分带来的安全、质量和成本等问题已经突显。主要表现在：①牛血清用量大，使细胞的生长状况对血清的依赖性大，而血清都是一种成分不确定的混合物，批与批之间的组分存在差异，直接影响产品质量的稳定性；②增加生产成本；③血清来源于动物，有可能携带传染源，对正在生长的细胞或者产品带来危险。在生产过程中控制和减少动物来源成分已成为一种趋势。美国 FDA 和美国农业部已经严密控制在细胞培养中胎牛血清的使用，以降低动物血清可能携带的传染源对细胞和制品带来的风险。

随着对血清成分和性能的研究，人们对血清中的主要成分如激素、生长因子、结合蛋白以及贴壁和扩展因子的性质和作用有了较全面和正确的认识，将血清中大部分营养成分用化学成分明确的营养物质如氨基酸等组合取代，开发研制了许多低血清培养和无血清培养基。本研究选用一种商业化的低血清培养基适应 BHK21 细胞，观察细胞的生长情况，并筛选出能稳定传代、繁殖较快、能适应大规模生产需要的细胞，建立生产用细胞种子库。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 BHK21 细胞 112 代，使用 50% MEM + 50％乳汉液加 10％新生牛血清的传统培养基培养，购自中国兽药监察所，由中农威特生物技术股份有限公司质量保证部保存，按常规组织培养法进行培养和传代。

1.1.2 培养基 MEM 细胞培养基为 GIBCO 公司产品，MEM SLM 低血清细胞培养基为北京清大天一生物技术有限公司产品，水解乳蛋白为 HYCLONE 公司产品。201 细胞培养液 50 % MEM 十 50％乳汉液）由中农威特生物技术有限公司生产部配制、过滤除菌。新生牛血清为兰州民海生物技术公司产品。

1.1.3 设备 培养容器为 3L 转瓶、100mL 方瓶、500mL 方瓶，均为国产设备。

1.2 方法

1.2.1 将复苏的 BHK21 (112 代）在 T75 的培养瓶中使用 201 培养基（50 % MEM + 50%乳汉液加 10%新生牛血清）培养 3 代，备用。

1.2.2 驯化细胞 细胞来自用传统培养基培养的 BHK21 细胞，细胞的驯化采用两个步骤。①驯化细胞适应 MEM SLM 培养基，首先在不降低血清用量的情况下驯化细胞适应低血清培养基，逐渐降低 201 培养基的含量、增加低血清培养基的含量。驯化过程采取 201 细胞培养液加 10 %血清培养的细胞对照，以比生长速率为主要指标，直至细胞完全适应，细胞生长状态与对照组姻似。② 驯钻细胞适应低血清环境，低血清适应过程也采用方瓶在 37℃ 静态培养，分阶段逐渐降低血清的用量。

1.2.3 生产用细胞种子库的建立 将适应低血清培养的细胞进行筛选，保留生长较快、传代稳定性较好、生长密度较高的细胞，保存各个代次的细胞种子，建立生产用细胞种子库。

1.2.4 细胞计数 台盼蓝染色，用血球计数板计数板。细胞密度与细胞活性的计算方法为：活细胞密度=平均每大格活细胞数×10^4，细胞活性=（活细胞数 / 细胞总数）×100%。

1.3 观察

每天用倒置显微镜观察各组细胞形态及生长增殖情况。

2 结果

2.1 细胞适应 MEM SLM 低血清培养基的情况

BHK21 细胞直接由 201 培养基十 10%新生牛血清转人 MEM SLM+5%新生牛血清时，细胞表现出不能适应新的培养基，出现贴壁延迟 1～2h，贴壁后不分裂繁殖，24h 后大部分细胞从瓶壁脱落。

表 1 BHK21 细胞适应 MEM SLM 的生长情况

培养基		201 培养基		50 % 201 + 50 % SLM		25 % 201 + 75 % SLM		MEM SLM	
		小转瓶	大方瓶	小转瓶	大方瓶	小转瓶	大方瓶	小转瓶	大方瓶
新生牛血清		10%	10%	5%	5%	5%	5%	5%	5%
分种比例		1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5
pH （接种时）		7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
贴壁比例	24h	50% ～ 60 %	50%～ 60 %	60%～ 70 %	60%～ 70 %	60%～ 70 %	60%～ 70 %	60%～ 70 %	60%～ 70 %
	48h	90%	90%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	72h	100%	100%	大多数细胞开始老化，表面有大量死细胞					
	96h	变圆，开始脱落		表面死细胞较多，但未脱落					
长成单层时间		72h	72h	48h	48h	48h	48h	48h	48h
细胞数量(10^8)		0.8～0.9	4～5	0.8～0.9	4～5	0.6～0.7	3～4	0.6～0.7	3～4

本试验采取分阶段适应的方法，分四个阶段逐步使细胞适应 MEM SLM，在替换培养基的初期，细胞也有不适应的表现，与对照组相比，细胞的生长延迟期明显变长；细胞活性由 90%降到 40%。细胞还可能出现大量死亡，不能继续传代等异常现象。但在维持 5、6 代后，细胞逐渐恢复正常，当细胞的比生长率、细胞数量等参数与对照组相近时，则认为细胞驯化成功。

2.2 BHK21 细胞对低血清培养的适应情况

在驯化细胞适应 MEM SLM 培养基的过程中，已将血清用量降到 5 %，在此基础上开始降低血清用量，即 5% →4 %→ 3%→ 2%→ 1 %，细胞在 T75 细胞瓶中的生长情况见表 2。

表 2 BHK21 细胞适应低血清培养的生长情况

培养基		201 培养基 +10%血清	MEM SLM +5%血清	MEM SLM+4%血清	MEM SLM+3%血清	MEM SLM+2%血清	MEM SLM +1%血清
分种比例		1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:3
pH （接种时）		7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
贴壁比例	24h	60% ～ 70 %	60%～70 %	60%～70 %	60%～70 %	60%～ 70 %	40%～ 50 %
	48h	100%	100%	100%	100%	100%	70%～80 %
	72h	大多数细胞开始老化，表面有大量死细胞					100 %
	96h	细胞开始变圆，开始脱落					
细胞数量 (10^7)		2	2.3～2.5	2.1～2.3	2～2.2	1.9～2.1	1.6～1.8
细胞活性		92% ～95 %	92%～95 %	92%～95 %	92%～95 %	92%～95 %	92%～95 %
连续传代次数		30	30	30	30	30	10

2.3 细胞种子库的建立

选择 MEM SLM + 4%新生牛血清培养的细胞，并筛选出传代稳定性好、生长较快的细胞，得到 121 代的细胞，编号 BHK21Pll2-10，按常规方法冻存，供生产用。

3 讨论与结论

细胞由原培养基（乳汉液 50 % + 50 % MEM 混合液，含 10%血清）改用 MEM SLM 低血清培养基后，细胞对新的培养基要有适应过程，细胞可能出现生长缓慢、贴壁性差、形态异常等不适应的表现，这时要根据细胞的生产情况，采取相应的措施，使细胞度过适应期，这个适应过程一般需要 5～6 代。原培养基和 MEM SLM 的成分有所不同，再加上 MEM SLM 中添加了部分血清成分的替代品，细胞可能要改

变某些代谢途径或代谢方式，所以需 要一定时间。当细胞的比生长率、细胞数量等参数与对照组相近时，则认为细胞驯化成功。

在阶段性降血清过程中，在最初的 3 代细胞没有表现出不适应现象，但在继续传代的过程中发现，添加 2%以下血清量的细胞，活性显著下降、贴壁性差、比生长率降低，很难继续传代。在细胞适应低血清培养的过程中，细胞出现了明显的反应滞后现象，这可能是由于细胞自身的能量积蓄，导致对外界环境变化的不敏感性，在血清用量较少（小于 2%）的情况下，当细胞消耗完这些能量积蓄后，细胞则表现出对低血清环境的不适应。随着血清浓度的降低，细胞的比生长率和细胞活性都有所下降，反映了血清的保护作用被削弱，而低血清培养基 MEM SLM 中的添加物成分有限，还不能完全替代血清中那些已知或未知的有用成分的作用，可能导致细胞内部某些关键酶的合成途径被阻断，使一些代谢途径被阻塞或膜的合成困难。由此看来，本试验所用的低血清培养基 MEM SLM，虽然添加了某些血清成分的替代品，但这些添加成分的种类和数量都有限，只能在一定程度上降低血清的用量。

综上所述，本试验所用的低血清培养基 MEM SLM，只有在添加 2%以上的血清量时，才能用于 BHK21 细胞的大规模培养，该培养基的使用，能够降低 BHK21 细胞的生产成本。

参考文献：

[1] 林福玉，陈昭烈等.大规模动物细胞培养的问题与对策[J].生物技术通报,2004,24(3):67-69.
[2] 张卓然.实用细胞培养基[M].人民卫生出版社.
[3] 薛庆善.体外培养的原理与技术[M].科学出版社.
[4] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M].北京出版社.
[5] 黄斌, 牛红星等.rCHO 细胞无血清适应及悬浮培养[J].华东理工大学学报, 2004,30(1):38-42.

（文章来源：《中国兽医科学》（下）；第 37 卷；增刊 2007：1030~1032）

接种密度对 BHK21 细胞在 MEM-SLM 培养液中生长的影响

苏 玲 1，2，刘学荣 1， 董文教 1 ，宋玉霞 1， 牟会琴 1，王国燕 1，王 晶 1，董金杰 1，
陈苗苗 1， 牟克斌 1， 黄银君 1
（中农威特生物科技股份有限公司， 甘肃 兰州 7300462.西北民族大学，甘肃 兰州 730000）

摘要：为探讨不同的接种密度对 BHK21 细胞在 MEM-SLM 培养液中生长的影响，本研究选用 1∶4 ～ 1∶9 六种不同的分种比例培养 BHK21 细胞 ，并分别于 24h、48h、72h、96h 观察和计数，检测细胞的生长密度和细胞活力。结果表明，以不同接种密度接种的 BHK21 细胞的生长密度不同，其中 1∶6 和 1∶7 的接种密度比较适合 BHK21 细胞在本试验条件下生长。

关键词 BHK21 细胞，MEM-SLM 培养液，接种密度，比生长速率

叙利亚仓鼠肾细胞(BHK21)或称金黄色仓鼠肾细胞来源方便，繁殖速度快，质量和外源因子易控制，

是经 WHO 推荐作为生产人用疫苗的细胞基质，适合于多种疫苗的大规模工业化生产。许多研究报道都认为细胞生长的最终密度直接与细胞的接种密度有关。一般认为，细胞接种密度越高，培养结束时所得细胞密度也越高，但细胞增殖倍数逐渐降低。而细胞接种密度较低时，细胞生长至理想的密度需要较长的时间，且培养结束时所得细胞密度较低，但细胞增殖倍数逐渐升高。因此，在细胞大规模工业化生产中，必须选择合适的接种密度，提高细胞的产量，同时尽可能地增加细胞的增殖倍数，提高培养基的利用率。在传统的 BHK21 细胞培养工艺中大多采用传统的培养基，即 MEM 加 10%的新生小牛血清，培养过程中细胞的分种比例控制在 1∶5 和 1∶6。本试验拟选用商业化的培养基 MEM-SLM，探讨 BHK-21 细胞在此试验条件下接种密度对细胞生长的影响，以确定适合大规模工业化生产的接种密度。

1．材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞：BHK21 细胞 112 代，使用 50%MEM+50%乳汉液加 10%新生牛血清的传统培养基培养，购自中国兽药监察所，由中农威特生物技术股份有限公司质量保证部保存和提供，中农威特生物科技股份有限公司研发部驯化适应 MEM SLM。

1.1.2 培养基：MEM 细胞培养基为 GIBCO 公司产品，MEM SLM 低血清细胞培养基为北京清大天一生物技术有限公司产品，水解乳蛋白为 HYCLONE 公司产品。

新生牛血清为兰州民海生物技术公司产品。

1.1.4 设备

T75 方瓶、XDS 实验室系列倒置显微镜、细胞培养箱、干烤消毒柜等设备均为国产设备。

1.2 方法

1.2.1 细胞传代　将已适应低血清培养的 BHK21 细胞用 MEM SLM 按照设计分种比例连续传代 5 代以上，每隔 24 小时观察细胞的生长情况，将结果取平均值，其中 1∶4 记为Ⅰ组，1∶5 记为Ⅱ组，1∶6 记为Ⅲ组，以此类推直到 1∶9，共计 6 组。

1.2.3 细胞计数

随机抽取每组不同培养时间的细胞各一瓶做细胞计数。细胞计数采用台盼蓝染色液染色 3～5min 后，用血球计数板点样计数细胞密度，并记录死细胞数。每次计数重复 4 次，并取平均值。

每毫升原悬乳液的细胞总数=N/4×10000×n，N=四大方格内的细胞总数，n=稀释倍数。

细胞活力=（活细胞数/细胞总数）×100%。

细胞比生长速率=（生长密度-接种密度）/（接种密度*时间）d－1 。

1.4 观察

每天用倒置显微镜观察各组细胞形态及生长增殖情况。

2．结果与讨论

2.1　不同接种密度时细胞的生长曲线

以不同的接种密度进行细胞培养，细胞生长曲线见图 1。试验结果表明提高细胞接种密度可提高最终的细胞密度，这与其它文献报道的结果一致。

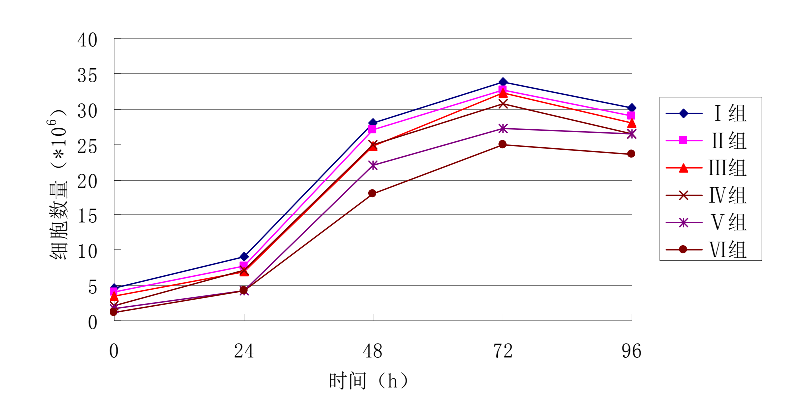


图 1　细胞接种密度对细胞生长的影响

细胞接种密度对贴壁培养的细胞而言是重要的生物影响因子，对细胞的贴壁生长及生长参数有非常显著的影响。细胞接种培养后，先经过一个在培养液中呈悬浮状态的悬浮期。此时细胞呈圆球形，接着细胞附着或贴附于培养瓶表面，称贴壁，悬浮期结束。当贴壁以后，细胞就开始分裂增殖，经过一定时期的延滞期后，细胞开始进入指数生长期。这是细胞增殖最旺盛的阶段，可作为判定细胞生长旺盛与否的一个重要标志。之后,随细胞数量不断增多、营养物质的不断消耗、生存空间渐趋减少、代谢产物的不断积累等，细胞相互接触汇合成片，发生接触抑制现象。但只要营养物质还未耗尽，细胞仍然能够进行增殖分裂，因此细胞数量仍在增多。但当细胞密度进一步增大，培养液中营养成分进一步减少、代谢产物持续增多时，细胞因营养的枯竭和代谢物的影响，则发生密度抑制，导致细胞分裂停止。

本试验结果表明，细胞生长至 96h 后停止增殖，细胞数量开始减少，在镜下观察发现，细胞长到 96h 后开始老化，形态变得细长，培养液中有大量的漂浮细胞，部分细胞甚至脱落。

2.2　细胞接种密度对细胞活力的影响

表 1 细胞接种密度对细胞活力的影响

组别	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Ⅰ 1∶4	97.0%	98.6%	97.2%	92.5%	91.4%
Ⅱ 1∶5	97.0%	97.2%	98.0%	90.4%	90.1%
Ⅲ 1∶6	96.7%	96.9%	96.0%	90.9%	90.0%
Ⅳ 1∶7	96.6%	97.2%	97.0%	91.7%	89.5%
Ⅴ 1∶8	96.2%	96.7%	95.8%	90.9%	89.7%
Ⅵ 1∶9	96.1%	96.8%	96.0%	91.4%	86.1%

随着细胞接种密度的减小，细胞活力趋于减小，而且每一组接种密度的细胞在培养 24h 后，细胞活力最高。可能的原因是，细胞培养的初期因为营养物质、生存空间等比较充足，溶氧度、PH 环境等比较适合细胞生长，细胞活力比较高。但在 48h 后，细胞之间为了争夺有限的营养物质、生存空间等，必然导致

一部分细胞死亡，细胞活力下降。

2.3 细胞接种密度对细胞比生长速率的影响

在细胞培养中，不同的接种密度可以得到不同的比生长速率，在本试验条件下不同接种密度及不同时间段的细胞比生长速率（μ）见表 2。

表 2 细胞接种密度对μ值的影响

组别	0～24h	24～48h	48～72h	72～96h
Ⅰ 1∶4	0.957	2.111	0.207	—0.107
Ⅱ 1∶5	0.950	2.462	0.027	—0.110
Ⅲ 1∶6	1.059	2.543	0.298	—0.130
Ⅳ 1∶7	2.310	2.472	0.232	—0.429
Ⅴ 1∶8	1.429	4.176	0.241	—0.033
Ⅵ 1∶9	2.650	3.286	0.389	—0.060

比生长速率表示在单位体积内单位量细胞经过单位时间增加的细胞量。孙详明，谭文松等曾报道细胞接种密度对延滞期的影响可以用细胞培养过程前 24h 的平均比生长速率（μ_{24}）来反映，μ_{24} 值越大，延滞期越短，μ_{24} 值越小，延滞期越长。细胞贴壁速率随着细胞接种密度的增加而提高，高细胞接种密度有利于细胞贴壁，细胞能较快进入生长期，但由于细胞的接种密度过大时，细胞贴壁后扩展受到限制，使得部分细胞不能正常生长；但当细胞接种密度较低时，这种现象不发生或非常轻微，细胞能较快的进入对数生长期；表 2 中的数据表明，随着细胞接种密度的减小，细胞的平均比生长速率逐渐增加。而且随着细胞的生长，不同时间段的平均比生长速率不同，有一个先升后降的过程。

3．结论

综上所述，在本试验条件下，即在 MEM-SLM 培养液中培养 BHK21 细胞，分种密度为 1∶6 和 1∶7 时，细胞在 48h 时活力最高，细胞数量达 2.48×10^7～2.50×10^7，平均比生长率达 2.508，增殖倍数在 8.235～12.138 之间，细胞增殖倍数较大，培养基利用率较高，同时细胞产量较大，适合大规模工业化生产。

参考文献：

[1] Mendonca R Z, Pereira C A. High density Vero cell culture on microcarriers in a cell bioreactor. Bioprocess Eng. 1995. 12: 279～282.

[2] Hu W S, Meier J, Wang D I C. A mechanistic analysis of the inoculum requirement for the cultivation of mammalian cells on microcarriers Biotechnol Bioeng. 1985. 27: 585～595.

[3] 薛庆善主编 《体外培养的原理与技术》，北京科学出版社，2001 年 2 月，第 561～562 页。

[4] 迟占有，蔡海波，夏泉鸣等 《脐血单个核细胞的搅拌悬浮培养》，2004 年，第 3 期，第 352～353 页。

[5] 上海市肿瘤研究所细胞生理组， 《细胞营养与组织培养》，上海：上海科学技术出版社，1996 年，第

308～335 页，第 366～372 页。
[6] 李彪如，童善庆，胡宝瑜等 《酶消化对肿瘤侵润淋巴细胞活力影响的研究》，实验生物学报，1994 年，第 27 卷(1 期)，第 104～107 页。
[7] 孙祥明，谭文松，张元兴等 《接种密度对 Vero 细胞在微载体表面生长的影响》，华东理工大学学报，1999 年，第 25 卷(4 期)，第 367～370 页。
（文章来源：《中国兽医科学》（下）；第 37 卷；增刊 2007：1035~1037）

不同血清浓度的低血清培养基培养 BHK21 细胞繁殖口蹄疫病毒的试验研究

刘学荣，宋玉霞，董文教 ，魏怀菊， 牟会琴，王国燕，王 晶，董金杰，
陈苗苗， 蔡 芸， 牟克斌， 黄银君
(中农威特生物科技股份有限公司， 甘肃 兰州 730046)

我国口蹄疫的流行由来已久，疫情复杂，我国在口蹄疫的防治上采用的是捕杀和免疫接种相结合的措施，疫苗接种在口蹄疫预防中仍起到非常重要的作用。我国现行口蹄疫灭活疫苗生产工艺相对落后，生产病毒的 BHK21 细胞全部来自转瓶培养，主要采用最基础的合成细胞培养基，甚至天然培养基（如水解乳蛋白）加入 10%左右新生牛血清。使用大量的新生牛血清带来的安全、质量和成本等问题已经突显。为此本公司试图采用低血清培养基培养 BHK21 细胞生产口蹄疫疫苗，该工作现已完成了细胞驯化和细胞培养试验，本试验将在此基础上用不同血清含量的低血清培养基培养 BHK21 细胞，并繁殖口蹄疫病毒，比较细胞生长情况和病毒效价，以确定适合生产实际的血清浓度。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞：BHK21 细胞 112 代，使用 50%MEM+50%乳汉液加 10%新生牛血清的传统培养基培养，购自中国兽药监察所，由中农威特生物技术股份有限公司质量管理部保存和提供，中农威特生物科技股份有限公司研发部驯化适应 MEM SLM。

1.1.2 病毒 口蹄疫病毒 ONXC/92 株细胞毒（猪牛羊口蹄疫 O 型灭活疫苗制苗毒株），由中农威特生物技术股份有限公司质量管理部保存和提供。

1.1.3 培养基：MEM 细胞培养基为 GIBCO 公司产品，MEM SLM 低血清细胞培养基为北京清大天一生物技术有限公司产品，水解乳蛋白为 HYCLONE 公司产品。

新生牛血清为兰州民海生物技术公司产品。

1.1.4 设备

T75 方瓶、XDS 实验室系列倒置显微镜、细胞培养箱、干烤消毒柜等设备均为国产设备。

1.2 方法

1.2.1 细胞传代 将已适应低血清培养的 BHK21 细胞用 MEM SLM 连续传代 30 代以上，分种比例为 1：5，

以传统培养基加 10%小牛血清培养的细胞为对照组。试验组的血清含量分别为 5%、4%、3%、2%和 1%。其中血清含量为 5%的记为Ⅰ组，血清含量为 4%的记为Ⅱ组，以此类推，共计五组。

在传代过程中任意选择三代观察细胞的生长状况，记录细胞接种密度和生长密度，取平均值。同时繁殖病毒，检测病毒液效价。

1.2.2 病毒效价检测　由中农威特生物科技股份有限公司质量检验室检测收获病毒液的 LD_{50} 和 $TCID_{50}$。

1.2.3 细胞计数　台盼蓝染色，用血球计数板计数。细胞密度、细胞活性与细胞比生长速率的计算方法为：

活细胞密度=平均每大格活细胞数×10^4

细胞活性=（活细胞数/细胞总数）×100%

细胞比生长速率=（生长密度-接种密度）/（接种密度*时间）*d^{-1}。

1.4 观察　每天用倒置显微镜观察各组细胞形态及生长增殖情况。

2　结果与分析

2.1 各种血清浓度的低血清培养基培养的 BHK21 细胞生长情况

已适应 MEM SLM 的 BHK21 细胞在血清含量大于 2%的情况下均能稳定传代，连续传代均在 30 代以上，能够满足生产实际需要。添加 5%、4%和 3%血清的试验组细胞均在 48h 达到最大量，细胞产量、细胞活性与对照组差异不大；添加 2%和 1%血清的试验组在 72h 达到最大量，细胞产量略低于对照组。但当细胞数量达到最大值后，试验组的细胞开始老化，大量细胞悬浮于培养液中，致使细胞数量减少较快，细胞活性也逐渐降低。BHK21 细胞在 24-48h 生长较快，平均比生长率在 1.74d^{-1} 以上，高于对照组。结果见表 1、表 2 和表 3。

表 1 不同血清浓度培养时细胞的生长情况（×10^7）

组别	对照组	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
细胞接种量	0.462	0.42	0.415	0.403	0.387	0.352
细胞数量（24h）	0.83	0.85	0.764	0.752	0.68	0.62
细胞数量（48h）	1.86	2.42	2.36	2.28	1.84	1.26
细胞数量（72h）	2.51	1.98	2.12	2.04	2.20	1.73
细胞数量（96h）	2.21	1.85	1.87	1.92	1.86	1.65
连续传代次数	30	30	30	30	30	10

表 2 不同血清浓度对细胞比生长率的影响

组别	对照组	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
0-24h	0.80	1.02	0.84	0.87	0.76	0.76
24-48h	1.24	1.85	2.09	2.03	1.71	1.03
48-72h	0.35	-0.18	-0.1	-0.11	0.20	0.37
72-96h	-0.12	-0.07	-0.12	-0.06	-0.15	-0.05

表 3 不同血清浓度对细胞活性的影响

组别	对照组	I	II	III	IV	V
24h	95.4%	96.3%	94.6%	97.1%	95.3%	94.5%
48h	96.2%	96.6%	95.2%	95.3%	97.5%	96.2%
72h	93.6%	90.4%	93.6%	94.0%	94.6%	95.5%
96h	88.2%	87.5%	90.4%	89.2%	86.2%	89.4%

试验结果表明，所用的低血清培养基中贴壁因子略显不足，再加上血清含量较少，使细胞进入指数生长期前的延滞期较长，培养初期（0～24h）比生长率较低；但该培养基的扩展因子相对丰富，细胞进入指数生长期后（24～48h），繁殖迅速，平均比生长率在 1.74d^{-1} 以上，同时这些扩展因子可能也促使细胞老化，即添加 5%、4%和 3%血清的试验组细胞均在 48h 后数量减少，添加 2%和 1%血清的试验组在 72h 后数量减少。

2.2 各种血清浓度的低血清培养基培养的 BHK21 细胞繁殖口蹄疫病毒的效价

各种血清浓度的低血清培养基培养的 BHK21 细胞繁殖口蹄疫病毒的效价检测结果见表 4。

表 4 各种血清浓度的低血清培养基培养的 BHK21 细胞繁殖口蹄疫病毒的效价

组别	第一试验		第二试验		第三试验		平均值	
	$TCID_{50}$	LD_{50}	$TCID_{50}$	LD_{50}	$TCID_{50}$	LD_{50}	$TCID_{50}$	LD_{50}
对照组	7.5	8.0	7.61	7.67	7.5	7.5	7.54	7.72
I	8.11	8.5	7.83	8.33	8.0	8.17	7.98	8.33
II	7.83	8.0	7.61	7.67	7.5	8.33	7.65	8.0
III	8.0	8.33	7.83	8.0	7.61	7.67	7.83	8.0
IV	7.61	8.5	8.17	8.0	7.83	7.67	7.87	8.0
V	7.61	8.33	8.37	8.0	7.61	7.67	7.86	8.0

试验结果表明，试验各组的病毒效价均达到疫苗规程规定的不小于 7.50 的标准，比对照组略高，该细胞适应 MEM SLM 后，仍对口蹄疫病毒敏感。血清浓度对病毒效价影响不大，只要在细胞数量较大、细胞活性较高时接毒，均能得到高效价的病毒液。

3．结论

用低血清培养基进行 BHK21 细胞大规模培养在国内尚属首次报道，本试验结果表明，低血清培养基 MEM SLM 营养丰富，能促进 BHK21 细胞快速生长，同时适应该培养基的 BHK21 细胞对口蹄疫病毒敏感性较好，繁殖的口蹄疫病毒液效价达到疫苗生产要求，因此，我们认为低血清培养基 MEM SLM 具有替代传统培养基用于口蹄疫疫苗生产的潜力。

Vero 细胞、BHK21 细胞的低血清培养和高密度培养研究

潘迎，罗海春，陈文庆
（北京清大天一生物技术有限公司）

提要 1、采用无蛋白的低血清细胞培养基培养 Vero 细胞、BHK21 细胞，细胞在低血清培养基中的生长，形态及增殖方面均优于加入 10％新生牛血清的传统培养基，且目标产物表达率显著提高，如 Vero 细胞狂犬疫苗生产病毒滴度比传统培养方式提高 0.4 左右。2、采用新型 3L 三层转瓶结合低血清细胞培养基培养 Vero 细胞、BHK21 细胞，细胞数量可增加 200％。3、采用无蛋白的低血清细胞培养基用于 Vero 细胞反应器培养生产狂犬疫苗效果良好

关键词 低血清细胞培养基，3L 三层转瓶，Vero 细胞，BHK21 细胞，疫苗，高密度细胞培养

动物细胞大规模培养广泛应用于抗体药物、基因治疗药物、人用疫苗、兽用疫苗以及基因工程药品等生物制品的生产[1]，目前主要采用最基础的合成细胞培养基（如 199、MEM 等）[2]，甚至天然培养基（如水解乳蛋白）加入 10％左右新生牛血清，在转瓶中培养细胞。随着对生物制品安全性要求的不断提高，在生产过程中控制和减少动物来源成分已成为一种趋势[3−4]。

美国 FDA 和美国农业部已经严密控制在细胞培养中胎牛血清的使用，以降低动物血清可能携带的传染源对细胞系和制品带来的风险。

在我国，疫苗等生物制品处于快速发展时期，目前生产企业大多采取加大固定资产投资的方式，即新建车间、大批量添置转瓶机、加大转瓶容量等方式提高产能，这种方式在一定程度上限制了生产的发展，并可能造成社会资源的浪费。

本文介绍的 Vero 细胞、BHK21 细胞低血清培养和高密度培养，用于人、兽疫苗（如狂犬疫苗、口蹄疫疫苗等）生产，可以大幅度降低新生牛血清使用量，提高生物制品安全性，明显降低细胞培养成本；结合新型 3L 三层转瓶的使用可以充分利用生产企业现有设备，大幅度提高细胞密度，提高企业生产能力，减少投资，降低企业成本。

1 材料与方法

1.1 材料：

细胞株：BHK21 细胞（中国兽医药品监察所）、Vero 细胞（中国药品生物制品检定所）

培养基及添加物：

MEM 细胞培养基（产品代码：MD605，批号：050712）、MEM SLM 低血清细胞培养基（产品代码：SLM120，批号：050818）（北京清大天一生物技术有限公司）

改良 199（HB）细胞培养基（产品代码：MD502 批号：050823）、199 SLM 低血清细胞培养基（产品代码：SLM110 批号：050818）、SXQ-1 低血清细胞培养基（产品代码：SLM100）（北京清大天一生物技术有限公司）

新生牛血清（批号：20050404）（武汉三利生物技术有限公司）

培养容器： 普通 3L 转瓶、新型 3L 三层转瓶（上海谦海生物科技有限公司）

设备： ZP-1 型 3L 瓶转瓶机（上海浦东冷冻干燥设备有限公司）、XDS 实验室系列倒置显微镜（重庆光电仪器总公司）、细胞培养恒温箱（自制）

1.2 方法：

1.2.1 将复苏的 Vero 及 BHK21 细胞在 T75 培养瓶中使用传统培养基（含 10％新生牛血清）培养三代，然后接种于普通 3L 转瓶及新型 3L 三层转瓶，使用低血清培养基与传统培养基（含 10％新生牛血清）37℃培养细胞。

1.2.2 复苏 BHK21 细胞，利用低血清培养基（含新生牛血清 4％）每 2 日传代一次，连续传代，与传统培养基（含新生牛血清 10％）对照。

1.2.3 Vero 细胞在普通 3L 转瓶中使用低血清培养基与传统培养基培养，对比滴度。

1.2.4 Vero 细胞在反应器中使用低血清培养基生产狂犬疫苗。

1.3 观察：

每日用倒置显微镜观察各组细胞形态及生长增殖情况。

2．结果

2.1 Vero 细胞和 BHK21 细胞在普通转瓶中低血清培养和传统培养的比较

2.1.1 Vero 细胞在普通转瓶中低血清培养和传统培养的比较

Vero 细胞在普通转瓶中采用 199 SLM 培养基低血清培养和采用改良 199（HB）添加 10％新生牛血清的传统培养的比较结果见表 2.1.1。其中 199 SLM 培养基为低血清 199 培养基，主要用于 Vero 等细胞的低血清培养；改良 199（HB）培养基为高缓冲性能的 199 培养基。

标 2.1.1 Vero 细胞在普通转瓶中低血清培养和传统培养的比较

项目	改良 199（HB）	199 SLM	199 SLM	199 SLM
血清量	10％	5％	3％	1％
接种细胞密度	5×10^4	5×10^4	5×10^4	5×10^4
pH（接种时）	7.0	7.0	7.0	7.0
细胞贴壁百分率（24h）	80	80	85	90
细胞分裂百分率（24h）	50	75	85	80
细胞长成单层时间（小时）	72-84	68-72	68-72	68-72
换液次数	1	1	1	1
细胞形态	正常	正常	正常	正常

由于是递减降血清培养，对细胞有一个驯化过程，因此当血清量降到 1％时，低血清培养基的贴壁率随着血清量的降低略有上升。低血清培养基的细胞分裂百分率明显优于改良 199 培养基，并且使用低血清培养基细胞长成单层的时间比改良 199 培养基短 4 至 8 小时。低血清培养基的细胞形态优于改良 199 培养基的细胞形态。

2.1.2 BHK21 细胞在普通转瓶中低血清培养和传统培养的比较

MEM SLM 低血清培养基与 MEM 培养基添加 10％新生牛血清培养 BHK21 细胞比较结果见表 2.1.2。

其中 MEM SLM 培养基为低血清 MEM 培养基，主要用于 BHK21 等细胞的低血清培养。

表 2.1.2 BHK21 细胞在普通转瓶中低血清培养和传统培养的比较

项目	MEM	MEM SLM	MEM SLM
血清量	10％	5％	3％
接种细胞密度	5×10^4	5×10^4	5×10^4
pH（接种时）	7.0	7.0	7.0
细胞贴壁百分率（24h）	80	80	75
细胞分裂百分率（24h）	60	75	70
细胞长成单层时间（小时）	120	96-108	96-108
换液次数	1	1	1
细胞形态	正常	正常	正常

低血清培养基与 MEM 培养基的贴壁率及分裂百分率均无明显差异。低血清培养基细胞长成单层的时间比 MEM 培养基短 12 至 24 小时。低血清培养基的细胞形态优于 MEM 培养基。

2.2 Vero 细胞和 BHK21 细胞在新型 3L 三层转瓶中低血清培养和传统培养的比较。

2.2.1 Vero 细胞在新型 3L 三层转瓶中低血清培养和传统培养的比较

采用新型 3L 三层转瓶，结合 199 SLM 低血清培养基与改良 199（HB）培养基添加 10％新生牛血清培养 Vero 细胞比较结果见表 2.2.1

表 2.2.1 Vero 细胞在新型 3L 三层转瓶中低血清培养和传统培养的比较

项目	改良 199（HB）	199 SLM	199 SLM	199 SLM
血清量	10％	5％	3％	1％
接种细胞密度	5×10^4	5×10^4	5×10^4	5×10^4
pH（接种时）	7.0	7.0	7.0	7.0
细胞贴壁百分率（24h）	95	95	95	90
细胞分裂百分率（24h）	90	80	90	80
细胞长成单层时间（小	120	96－108	96-108	120
换液次数	2	2	2	2
细胞形态	正常	正常	正常	正常

低血清培养基与改良 199 培养基在贴壁百分率及细胞分裂百分率上差异不大，而含 3％血清及 5％血清的低血清培养基细胞长成单层的时间较改良 199 培养基和含 1％血清的低血清培养基短 12-24 小时。低血清培养基的细胞形态优于改良 199 培养基。

2.2.2 BHK21 细胞在新型 3L 三层转瓶中低血清培养和传统培养的比较

采用新型 3L 三层转瓶，结合 MEM SLM 低血清培养基与 MEM 培养基添加 10％新生牛血清培养 BHK21 细胞比较结果见表 2.2.2

表 2.2.2 BHK21 细胞在新型 3L 三层转瓶中低血清培养和传统培养的比较

项目	MEM	MEM SLM	MEM SLM
血清量	10％	5％	3％
接种细胞密度	5×10^4	5×10^4	5×10^4
pH (接种时)	7.0	7.0	7.0
细胞贴壁百分率（24h）	80	80	75
细胞分裂百分率（24h）	60	60	60
细胞长成单层时间（小	120	96-108	96-108
换液次数	2	2	2
细胞形态	正常	正常	正常

低血清培养基与 MEM 培养基的贴壁百分率及细胞分裂百分差异不大，低血清培养基比 MEM 培养基长成单层的时间短 12～24 小时。培养后期低血清培养基细胞形态优于 MEM 培养基细胞形态。

2.3 用低血清培养基结合使用新型 3L 三层转瓶培养 Vero 细胞和 BHK21 细胞与用传统培养基结合使用普通转瓶培养比较

单层转瓶内细胞贴壁为一个面，新型 3L 三层转瓶内细胞贴壁为五个面，三层转瓶的有效表面积约为单层转瓶的 3.5 倍。使用三层转瓶时细胞接种数量要适量增加，如不增加细胞接种数量则需增加换液次数。

2.3.1 Vero 细胞在新型 3L 三层转瓶中低血清培养与普通 3L 转瓶中传统培养的生长比较

采用新型 3L 三层转瓶，结合 199 SLM 低血清培养基与普通 3L 转瓶结合改良 199（HB）培养基添加 10％新生牛血清培养 Vero 细胞比较结果见表 2.3.1

表 2.3.1 Vero 细胞在新型 3L 三层转瓶中低血清培养与在普通 3L 转瓶中传统培养的比较

项目	改良 199	199 SLM	199 SLM
血清用量%	10	5	3
液体量（ml）	200	500	500
pH（接种时）	7.0	7.0	7.0
接种细胞密度	5×10^4	5×10^4	5×10^4
细胞长成单层天数	3	4～5	4～5
换液次数	1	2	2
长成致密单层时细胞数量	3×10^8	9×10^8	9×10^8

在相同的细胞接种密度的情况下，低血清培养基在三层瓶中的液体量是改良 199 培养基的 2.5 倍，细胞长成单层的天数是改良 199 培养基的 1.5 倍左右。但是血清量可以降低 70％，而细胞量增加 3 倍左右。如在三层瓶中提高细胞接种密度可缩短细胞长成单层的时间。

2.3.2 BHK21 细胞在新型 3L 三层转瓶中低血清培养与普通 3L 转瓶中传统培养的生长比较

采用新型 3L 三层转瓶，结合 MEM SLM 低血清培养基与普通 3L 转瓶结合 MEM 培养基添加 10％新生牛血清培养 BHK21 细胞比较结果见表 2.3.2

表 2.3.2 BHK21 细胞在新型 3L 三层转瓶中低血清培养与在普通 3L 转瓶中传统培养的比较

项目	MEM(单)	MEM SLM (三)	MEM SLM（三）
血清用量%	10	5	3
液体量（ml）	200	500	500
pH (接种时)	7.0	7.0	7.0
接种细胞密度	5×10^4	5×10^4	5×10^4
细胞长成单层天数	3	4-5	4-5
换液次数	1	2	2
长成致密单层时细胞	3×10^8	9×10^8	9×10^8
细胞形态	正常	正常	正常

在相同的细胞接种密度的情况下，低血清培养基在三层瓶中的液体量是 MEM 培养基的 2.5 倍，细胞长成单层的天数是 MEM 培养基的 1.5 倍左右。但是血清量可以降低 70％，而细胞量增加 3 倍左右。如在三层瓶中提高细胞接种密度可缩短细胞长成单层的时间。

2.4 低血清培养基用于 BHK21 细胞的传代试验，除培养基种类和新生牛血清添加量区别外，试验条件方法完全一致。

表 2.4.1 MEM SLM 低血清培养基与 MEM 培养基用于 BHK21 细胞的传代比较

项目	细胞培养基	新生牛血清添加量	1—5 代（方瓶）	6—8 代（转瓶）	9—12 代（转瓶）	13 代以后（转瓶）
低血清组	MEM SLM 低血清培养基	4％	细胞形态及致密度均优于对照组	细胞形态及致密度均优于对照组	无明显差异	有部分老化脱落
对照组	基础 MEM	10％	正常		无明显差异	正常

低血清培养基与对照培养基所传代细胞留作种细胞均可 1：5 连续传代。

低血清培养基营养成分优于基础培养基，易使细胞增殖迅速，代谢旺盛，代谢产物对细胞有不良影响，易产生细胞老化脱落现象。因此需要适当增加换液次数，增加传代频率。

2.5 低血清培养基用于 Vero 细胞狂犬疫苗的毒力试验。

某狂犬疫苗生产企业采用普通 3L 转瓶生产狂犬疫苗情况见表 2.5.1

表 2.5.1 199 SLM 培养基与 199（改良 HB）培养基用于 Vero 细胞狂犬疫苗滴度比较

细胞培养基	新生牛血清添加量	1 次苗滴度	2 次苗滴度	平均滴度
199 SLM-1	5％	7.066	6.820	6.943
199 SLM-7	5％	6.986	6.866	6.926
199（HB）	10％	6.661	6.402	6.532

2.6 低血清培养基用于反应器 Vero 细胞狂犬疫苗的生产 [5]

某狂犬疫苗生产企业采用 NBS 反应器生产狂犬疫苗情况见表 2.5.1

表 2.6.1　低血清培养基用于反应器 Vero 细胞狂犬疫苗生产的情况

细胞培养基	细胞扩增中新生牛血清添加量	病毒滴度
SXQ-1	5％	≥8.5

3．讨论：

3.1　采用 199 SLM 和 MEM SLM 低血清培养基分别培养 Vero 细胞、BHK21 细胞，新生牛血清用量可以从 10％降至 3％，减少新生牛血清使用批次和批间差的影响，减少生物制品纯化损失，减少由于不确定蛋白或者其它血清组分带来干扰和差异的风险，提高制品安全性。低血清培养基可以在方瓶、3L 转瓶、15L 转瓶及生物反应器中培养细胞，在疫苗生产中可以达到低血清高密度的培养效果。

低血清培养基营养成分优于基础培养基，易使细胞增殖迅速，代谢旺盛，代谢产物对细胞有不良影响，易产生细胞老化脱落现象。因此需要适当增加换液次数，增加传代频率。获取同样的细胞量，用低血清培养基将比用传统培养基缩短近 1/3 的时间，可提高生产效率。

采用新型 3L 三层转瓶配合低血清培养基培养细胞，细胞量是普通转瓶的 3 倍左右。3L 三层转瓶培养时培养基利用率较高，可相对降低培养液成本，细胞收获方法与单层转瓶相同，可以降低劳动强度，因此可充分利用现有的设备（转瓶机），大幅度提高细胞量，从而提高疫苗产量质量，减少固定资产投资，大大降低制品综合成本,提高效益。

3.2 采用 199 SLM 低血清培养基培养 Vero 细胞分泌狂犬疫苗病毒，滴度明显高于采用 199 培养基传统培养获得的滴度。

3.3 采用 MEM SLM 低血清培养基 BHK21 细胞，在本实验情况下 12 代内细胞形态和致密度均优于 MEM 培养基传统培养情况，因而可以预期其产生的口蹄疫、甲肝等疫苗生产的病毒产量将提高。

低血清培养基结合 3L 三层转瓶培养细胞还未接毒进行滴度测试，有待进一步研究。

3.4 低血清培养基用于反应器 Vero 细胞狂犬疫苗的生产，实践证明效果良好。

综上所述，在生物制品生产中，系统、全面的研究动物细胞培养技术，不断追求最佳的细胞培养技术，大规模高密度低血清动物细胞培养可以有效的提高生产效率，有效地提高安全性，有效降低生物制品成本，提高利润率，增强产品市场竞争力。

参考文献：

林福玉，陈昭烈等. 大规模动物细胞培养的问题及对策[J]. 生物技术通报，2004.

张卓然. 实用细胞培养技术[M]. 人民卫生出版社.

薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 科学出版社.

鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京出版社.

孙文，毕军等. 50L 生物反应器培养基狂犬病毒工艺研究[J]. 第八次全国生物制品学术会议论文汇编.

不同培养基在猪伪狂犬病活疫苗生产中的应用研究

岑小清，房宜康，吴文福

（广东永顺生物制药有限公司，广州 510630）

摘要 本文利用猪伪狂犬病毒弱毒株 Bartha-K61 进行细胞培养，观察不同细胞培养基维持鸡胚成纤维细胞单层（CEF）生长情况，并测定病毒产量（$TCID_{50}$ / ml）。结果在生产条件下，应用低血清培养基（MEM-SLM）添加 0.5～2%新生犊牛血清，制备的维持液培养细胞单层生长良好，细胞间隙不明显，细胞形态正常。细胞单层接种病毒培养 18-24 小时左右，有少量细胞形成 CPE，继续培养至 48 小时左右，70%以上细胞产生 CPE，此时病毒增殖达到高峰，测定病毒产量达到 $2\times10^{-6.75}$～$2\times10^{-7.5}TCID_{50}$/ ml，符合猪伪狂犬病活疫苗制苗要求，实际应用低血清培养基制备的活疫苗可有效防制疫苗注射引起的过敏反应。

关键词 伪狂犬病；细胞培养；低血清培养基；活疫苗

猪伪狂犬病活疫苗的生产培养基采用人工合成培养基，需要添加新生犊牛血清，当添加量大于 2%时，制备的活疫苗容易引起猪体严重的过敏反应。为了降低猪体过敏反应发生的几率，减轻过敏反应的程度，本试验对普通细胞培养基（BD-199）和清大天一低血清培养基（MEM-SLM）进行了应用比较研究，取得了在低血清培养条件下维持细胞良好产毒情况的试验结果，现报告如下。

1 材料

1.1 毒种 伪狂犬病毒 Bartha-K61 弱毒株冻干毒，由本公司王卓明研究员提供，本班组制成的细胞毒毒价可达到 $2\times10^{7.5}TCID_{50}$/ml。

1.2 细胞培养溶液 包括 7.5%碳酸氢纳溶液、20,000IU/ ml 的青链双抗溶液、细胞生长液（乳汉氏液）和 0.25%胰蛋白酶溶液，均自行配制。

1.3 细胞培养维持液 培养基 BD-199 粉购自广州合华科技有限公司， MEM-SLM 粉购自清大天一公司，工作液由本班组配制并作过滤除菌。

1.4 新生犊牛血清 购自郑州佰安公司，无菌、无支原体及其它外源污染。

1.5 SPF 种蛋购自北京梅里亚公司。

2 方法

2.1 鸡胚成纤维细胞单层（CEF）的制备 SPF 种蛋孵化至 10 天龄，按照“兽用生物制品规程”的方法制成。

2.2 接毒和收获 CEF 培养 24 小时后长成致密的单层细胞，倒出生长液，接入 0.3%～0.5%的 PRVF1 细胞毒，吸附 40～60 分钟，对照组（Ⅰ和Ⅱ）分别加入血清含量为 2%及 1%的 BD-199 培养基制备的维持液；试验组（Ⅰ和Ⅱ）分别加入血清含量为 2%及 0.5%MEM- SLM 低血清培养基制备的维持液。均调整 PH7.0 左右，继续培养观察细胞生长状态及特异性细胞病变（CPE）形成，并进行详细记录。一般继续培养至 48

小时 70%以上的细胞出现特异性细胞病变（CPE）时，摇下瓶壁上的细胞连同维持液，收集于无菌的玻璃瓶中，在-15℃以下冷冻保存作细胞毒液，同时抽样保存备用。

2.3 细胞毒液效价测定 用小方瓶鸡胚成纤维细胞（收获的前 24 小时制备）测定细胞毒液毒价，并以细胞半数感染量（$TCID_{50}$）计算病毒滴度。

3 结果

3.1 维持细胞生长状态比较 在维持液血清含量同为 2%的条件下，培养 18-20 小时，对照组 BD-199 维持液培养的 CEF 单层细胞生长良好，细胞之间间隙很少，细胞形态正常。试验组

表 1 不同培养基培养 CEF 细胞生长情况和病毒特异性 CPE 形成情况比较

组别		维持液种类	血清含量（%）	细胞单层生长状态	病毒特异性 CPE 形成（18 小时）
试验组	I	MEM SLM	2%	细胞单层生长状态优良，无可见细胞间隙，细胞形态良好	少量细胞形成 CPE
	II	MEM SLM	0.5%	细胞单层生长良好，细胞间隙不明显，细胞形态正常	少量细胞形成 CPE
对照组	I	BD-199	2%	细胞单层生长良好，细胞之间间隙很少，形态正常	少量细胞形成 CPE
	II	BD-199	1%	细胞单层生长状态变差，形态瘦长，细胞间隙增大	少量细胞形成 CPE

MEM-SLM 维持液培养的单层细胞生长优良，细胞之间无可见间隙，细胞形态良好，（见表 1）。

当对照组血清含量降至 1%、试验组血清含量降至 0.5%时，对照组单层细胞生长状态明显变差、形态变得瘦长、细胞之间间隙增大。这时试验组细胞单层生长状态变化不明显，细胞形态正常，细胞之间间隙增大不明显。

表 2 不同培养基在猪伪狂犬病活疫苗生产中不同批次细胞毒液的 $TCID_{50}$/ ml 比较

批次	维持液种类	维持液血清含量	$TCID_{50}$/ ml
060713	BD-199	2%	$2\times10^{-7.0}$
	MEM-SLM	2%	$2\times10^{-7.25}$
060728	BD-199	2%	$2\times10^{-7.25}$
	MEM-SLM	2%	$2\times10^{-7.5}$
060811	BD-199	2%	$2\times10^{-7.25}$
	MEM-SLM	2%	$2\times10^{-7.25}$
060818	BD-199	2%	$2\times10^{-7.0}$
	MEM-SLM	2%	$2\times10^{-7.25}$
070503	BD-199	1%	$2\times10^{-6.5}$
	MEM-SLM	0.5%	$2\times10^{-7.0}$
070510	BD-199	1%	$2\times10^{-6.75}$
	MEM-SLM	0.5%	$2\times10^{-7.25}$
070523	BD-199	1%	$2\times10^{-6.25}$
	MEM-SLM	0.5%	$2\times10^{-6.75}$
070530	BD-199	1%	$2\times10^{-6.5}$
	MEM-SLM	0.5%	$2\times10^{-7.0}$

3.2 细胞毒液的 $TCID_{50}$ 比较 在血清含量等于或低于 2%的条件下，低血清培养基 MEM-SLM 对鸡胚成纤

维细胞的维持生长作用略优于 BD-199 培养基。两种培养基在变动血清添加量的条件下维持细胞，都能在接毒后培养 18 小时左右开始产生 CPE，培养 48 小时左右 CPE 达 70%以上。

当血清添加量为 2%时，BD-199 液与 MEM SLM 液培养的病毒滴度相近，且都能达到 $2\times10^{-7.0}$ 以上。不同批次猪伪狂犬病活疫苗生产结果显示，BD-199 培养液的血清添加量降到 1%，MEM-SLM 培养液的血清添加量降到 0.5%时，前者培养的病毒滴度下降明显，后者下降幅度则较少（见表 2）。

4 小结和讨论

本应用比较研究的结果说明，低血清培养基在猪伪狂犬病活疫苗生产中取得成功。采用 BD-199 维持液培养 CEF 繁殖伪狂犬病病毒，实验结果说明血清添加量一般不宜低于 2%，才能达到所需要的病毒效价。而采用 MEM-SLM 维持液培养病毒，血清添加量可降至 0.5%，培养液病毒效价仍然可以达到配苗标准。MEM-SLM 培养基可完全取代 BD-199 培养基，用于大规模的伪狂犬病疫苗生产。本研究结果对于采用低血清培养基培养其它细胞，或者生产其它病毒细胞苗具有参考意义。

猪用的各种疫苗中含有病毒、犊牛血清、蔗糖脱脂乳保护剂、乳蛋白等多种抗原物质，也可能是致敏原，对于猪是异体蛋白，都可能在使用中存在过敏现象。从疫苗的安全角度考虑，配苗毒液血清含量越低，猪群的非特异性异源蛋白过敏反应率也越低。采用 MEM-SLM 培养液可有效降低疫苗的血清含量，从而大大地降低猪群过敏反应。这与实际应用的结果是一致的。

参考文献

（1）王明俊等主编《兽医生物制品学》，北京：中国农业出版社，1997。
（2）中华人民共和国农业部《中华人民共和国兽医生物制品规程》，1992。

清大有为®

SKYWING®

我们通过积极向上的团队

以人为本的文化

共同努力

为生命提供养分

为人类健康贡献力量

敬请关注清大天一网站：
http://www.tsinghuaty.com/　 **http://www..cellculture.com.cn/**
地址：北京市昌平科技园区白浮泉路 **11** 号
邮编：**102200**
电话：**（010）80110248　80110922**
传真：**（010）80110230**
Email：office@tsinghuaty.com